

SDS-PAGE ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Εμβιομηχανική και Βιοϊατρική Τεχνολογία
Τμήμα Μηχανολόγων Μηχανικών | Ε.Μ.Π.

Χειμερινό Εξάμηνο 2015

Γενικά

- Οι **πρωτεΐνες** είναι σύνθετα βιομόρια αποτελούμενα από αμινοξέα (πεπτίδια), λόγω διαφορετικού αριθμού αμινοξέων και αμινοξικής σύστασης έχουν διαφορετικό μοριακό βάρος. Επίσης έχουν αρνητικό ή θετικό ολικό φορτίο ανάλογα με το pH.
- Η **ηλεκτροφόρηση** βασίζεται στη μετακίνηση φορτισμένων μορίων κάτω από την επίδραση ενός ηλεκτρικού πεδίου
- Εφαρμογές:
 - ποσοτικό και ποιοτικό έλεγχο
 - προσδιορισμό MB
 - έλεγχος της καθαρότητας δείγματος

Αρχή Μεθόδου

- Ο διαχωρισμός των μορίων σε πηκτή πολυακρυλαμίδης (PAGE) σε συνδυασμό με SDS, γίνεται με βάση το μοριακό τους βάρος.
- Το SDS είναι απορρυπαντικό το οποίο αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες και τους δίνει το αρνητικό φορτίο.
- Οι πρωτεΐνες μετακινούνται από τον αρνητικό πόλο στο θετικό.
- Τα μικρότερα μόρια κινούνται ταχύτερα από εκείνα μεγαλύτερου μοριακού βάρους.

Σκοπός Εργασίας

- Ο ποιοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών σε υγιή δείγματα ούρων και δείγματος ασθενούς με χρόνια νεφροπάθεια

Εξοπλισμός/Υλικά

- Συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης
- Τροφοδοτικό
- Προκατασκευασμένα Gel (Bio-Rad, 456-1044)
- 1x Running Buffer (25mM Tris, 192mM Glycine, 0.1% SDS)
- 2x Sample Buffer (Bio-Rad, 161-0747)
- Protein Standard (Life Technologies, LC5925)
- 0.5 mg/mL BSA (Bovine Serum Albumin)
- 10x DTT (Dithiotreitol)
- Coomassie Stain (Life Technologies, LC6060)

Διαδικασία

- Τοποθέτηση gel (πηκτή) στη συσκευή
- Προσθήκη 1x Running Buffer
- Τοποθέτηση δειγμάτων στις θέσεις της πηκτής (αφού πρώτα προετοιμαστούν, βλ. Παρακάτω)
- Ρύθμιση συνθηκών για το τρέξιμο (100V, 90min)
- Αφαίρεση της πηκτής από τη συσκευή
- Ξέπλυμα με νερό για 5 min (3 φορές)
- Προσθήκη 40mL Coomassie Stain για 1h @RT
- Ξέπλυμα με νερό
- Φωτογράφιση της πηκτής και υπολογισμός μοριακού βάρους πρωτεϊνών

Προετοιμασία Δειγμάτων

	1η θέση	2 ^η θέση	3 ^η θέση	4 ^η θέση	5 ^η θέση	6 ^η θέση	7 ^η θέση	8 ^η θέση	9 ^η θέση	10 ^η θέση
Protein Standard	10 μ L	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2x Sample Buffer	-	10 μ L	10 μ L	20 μ L	20 μ L	20 μ L	20 μ L	20 μ L	20 μ L	20 μ L
BSA	-	8 μ L	8 μ L	-	-	-	-	-	-	-
DTT	-	-	2 μ L	4 μ L	4 μ L	4 μ L	4 μ L	4 μ L	4 μ L	4 μ L
H ₂ O	-	2 μ L	-	-	-	-	-	-	-	-
Δείγμα	-	-	-	16 μ L	16 μ L	16 μ L	16 μ L	16 μ L	16 μ L	16 μ L

Θέρμανση στους 95°C για 2 min

Εκτίμηση Μοριακού Βάρους

- Δημιουργία πρότυπης καμπύλης $\log MW$ σε σχέση με τη σχετική κινητικότητα (R_f)
- $R_f = \frac{\text{Μετανάστευση Πρωτεΐνης}}{\text{Μετανάστευση Μετώπου Χρωστικής}}$